

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Yukiko ISHIKAWA, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: METHOD FOR PRODUCING TARGET SUBSTANCE BY FERMENTATION

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS  
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number \_\_\_\_\_, filed \_\_\_\_\_, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):  
Application No. \_\_\_\_\_ Date Filed \_\_\_\_\_
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2002-203764	July 12, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. \_\_\_\_\_ filed \_\_\_\_\_
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number \_\_\_\_\_  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. \_\_\_\_\_ filed \_\_\_\_\_; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s) \_\_\_\_\_  
☐ are submitted herewith  
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, MCCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618



22850

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 7月12日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-203764

[ ST.10/C ]:

[ JP2002-203764 ]

出 願 人

Applicant(s):

味の素株式会社

2003年 1月24日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎

出証番号 出証特2003-3000870

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-9999

【提出日】 平成14年 7月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 発酵法による目的物質の製造法

【請求項の数】 10

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 石川 有紀子

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 今泉 明

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 松井 和彦

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 児島 宏之

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089244

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100090516

    【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法による目的物質の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 目的物質の生産能を有し、かつ、A r c A タンパク質が正常に機能しないように改変された  $\gamma$  - プロテオバクテリア。

【請求項 2】 正常に機能する A r c A タンパク質が、下記 (A) 又は (B) に記載のタンパク質である請求項 1 に記載の  $\gamma$  - プロテオバクテリア。

(A) 配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、 $\gamma$  - プロテオバクテリアにおいて、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質。

【請求項 3】 正常に機能する A r c A タンパク質が、配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、かつ、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質である請求項 1 に記載の  $\gamma$  - プロテオバクテリア。

【請求項 4】 正常に機能する A r c A タンパク質が、配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列において、2 以上、かつ、2 0 以下のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、 $\gamma$  - プロテオバクテリアにおいて、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質である請求項 1 に記載の  $\gamma$  - プロテオバクテリア。

【請求項 5】 染色体上の a r c A 遺伝子が破壊されたことにより A r c A タンパク質が正常に機能しないことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の  $\gamma$  - プロテオバクテリア。

【請求項 6】 前記 a r c A 遺伝子が、下記 (a) 又は (b) に記載の D N A である請求項 5 に記載の  $\gamma$  - プロテオバクテリア。

(a) 配列番号 1 7 の塩基番号 1 0 1 ~ 8 1 7 からなる塩基配列を含む D N A。

(b) 配列番号 1 7 の塩基番号 1 0 1 ~ 8 1 7 からなる塩基配列又は同塩基配列

から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 前記 $\gamma$ -プロテオバクテリアは、エシェリヒア属細菌である請求項1～6のいずれか一項に記載の $\gamma$ -プロテオバクテリア。

【請求項8】 前記目的物質がL-アミノ酸である請求項1～7のいずれか一項に記載の $\gamma$ -プロテオバクテリア。

【請求項9】 前記L-アミノ酸がL-リジン又はL-グルタミン酸である請求項8に記載の $\gamma$ -プロテオバクテリア。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか一項に記載の $\gamma$ -プロテオバクテリアを培地で培養し、目的物質を該培地又は菌体中に生成蓄積させ、該培地又は菌体より目的物質を採取することを特徴とする目的物質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵工業に関し、詳しくは微生物を利用した発酵法によりL-アミノ酸などの目的物質を効率よく製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

細菌の細胞は、様々な環境に適応するために、代謝経路や呼吸経路などを改変させてきた。エネルギー代謝において、大きな役割を果たす制御システムとして、Arc (aerobic respiration control)、fnr (fumarate nitrate reduction) が知られている。これらは、ArcA、Fnrというエシェリヒア・コリとその近縁種に普遍的に存在するグローバルレギュレータータンパク質であり、前者はエシェリヒア・コリ染色体の0分の位置に存在するarcA遺伝子によりコードされ、後者は29分の位置に存在するfnr遺伝子によりコードされ、両者はともに、嫌気的条件下において数多くの因子を制御することにより、細胞をその環境に適応させる。また、ArcAタンパク質、Fnrタンパク質は転写因子であり、嫌気的条件下において、エシェリヒア・コリ染色体上のターゲット遺伝子のプロモーター領域に直

接結合することにより、そのターゲット遺伝子の発現を正または負に制御することが明らかとなっている (S. Iuchi et al., Cell, 66, 5-7 (1991))。

【 0 0 0 3 】

最近では、DNAマイクロアレイ技術を用いて、エシェリヒア・コリ由来ArcAタンパク質、Fnrタンパク質のようなグローバルなレギュレーターをコードする遺伝子の破壊株の発現プロファイルがデータベース化され、公開されている ([http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/get\\_htext?Exp\\_DB+-n+Bget-bin/get\\_htext?Exp\\_DB+-n+B](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/get_htext?Exp_DB+-n+Bget-bin/get_htext?Exp_DB+-n+B))。

【 0 0 0 4 】

これまでに、ArcAタンパク質は、TCAサイクル上の遺伝子の発現を負に制御することが知られており (S. Iuchi et al., Cell, 66, 5-7 (1991))、このデータベース上のarcA破壊株においてはTCAサイクル上の遺伝子の発現が上昇していることが明らかになっている。一方、Fnrタンパク質は嫌氣的条件で機能する呼吸経路の遺伝子発現を正に調節することが知られている。

【 0 0 0 5 】

グローバルな因子の破壊株における発現プロファイルで、arcA破壊株と同様にTCAサイクル上の遺伝子発現が上昇する株としてdam破壊株が挙げられる (2001年 日本バイオインダストリー協会資源生物変換研究会主催 シンポジウム「ゲノム時代のグリーンバイオテクノロジー」にて、奈良先端大 森浩禎 口頭発表)。

【 0 0 0 6 】

Damタンパク質は、細胞内の制限修飾系に関与する修飾因子のメチラーゼであり、エシェリヒア・コリ染色体の76分の位置に存在するdam遺伝子によりコードされる (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87 (23), 9454-9458 (1990))。

【 0 0 0 7 】

これまでのところ、arcA遺伝子、fnr遺伝子、dam遺伝子などのグローバルな因子の発現調節を行うことによる物質生産の向上に関する報告はなされていない。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、エシェリヒア属細菌等の  $\gamma$  -プロテオバクテリアを用いて発酵法により有用物質を生産するに際し、生産効率を向上させることを課題とする。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、 $\gamma$  -プロテオバクテリアに普遍的に存在するレギュレータータンパク質をコードする遺伝子を改変することで、 $\gamma$  -プロテオバクテリアによる物質生産を改善させ得ることを見出した。すなわち、 $\gamma$  -プロテオバクテリアにおいてarcA遺伝子を破壊することにより、目的物質の生産能が改善されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち本発明は、以下のとおりである

(1) 目的物質の生産能を有し、かつ、ArcAタンパク質が正常に機能しないように改変された $\gamma$  -プロテオバクテリア。

(2) 正常に機能するArcAタンパク質が、下記(A)又は(B)に記載のタンパク質である(1)の $\gamma$  -プロテオバクテリア。

(A) 配列番号18に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号18に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、 $\gamma$  -プロテオバクテリアにおいて、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質。

(3) 正常に機能するArcAタンパク質が、配列番号18に示すアミノ酸配列と70%以上の相同性を有し、かつ、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質である(1)の $\gamma$  -プロテオバクテリア。

(4) 正常に機能するArcAタンパク質が、配列番号18に示すアミノ酸配列において、2以上、かつ、20以下のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、 $\gamma$  -プロテオバクテリアにおいて、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質である(1)の $\gamma$  -プロテオバクテリア



。

(5) 染色体上の *a r c A* 遺伝子が破壊されたことにより *A r c A* タンパク質が正常に機能しないことを特徴とする(1)～(4)のいずれかの  $\gamma$ -プロテオバクテリア。

(6) 前記 *a r c A* 遺伝子が、下記 (a) 又は (b) に記載の DNA である(5)の  $\gamma$ -プロテオバクテリア。

(a) 配列番号 17 の塩基番号 101～817 からなる塩基配列を含む DNA

。

(b) 配列番号 17 の塩基番号 101～817 からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、そのタンパク質が正常に機能する場合に比べて、同タンパク質が正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させるタンパク質をコードする DNA。

(7) 前記  $\gamma$ -プロテオバクテリアは、エシェリヒア属細菌である(1)～(6)のいずれかの  $\gamma$ -プロテオバクテリア。

(8) 前記目的物質が L-アミノ酸である(1)～(7)のいずれかの  $\gamma$ -プロテオバクテリア。

(9) 前記 L-アミノ酸が L-リジン又は L-グルタミン酸である(8)の  $\gamma$ -プロテオバクテリア。

(10) (1)～(9)のいずれかの  $\gamma$ -プロテオバクテリアを培地で培養し、目的物質を該培地又は菌体中に生成蓄積させ、該培地又は菌体より目的物質を採取することを特徴とする目的物質の製造法。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】

<1>本発明の  $\gamma$ -プロテオバクテリア

本発明に用いる  $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、エシェリヒア属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、サルモネラ属、モルガネラ属など、 $\gamma$ -プロテオバクテリアに属する微生物であって、目的物質を生

産する能力を有するものであれば、特に限定されない。具体的にはNCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースに記載されている分類により  $\gamma$ -プロテオバクテリアに属するものが利用できる (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?mode=Tree&id=1236&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>)。

## 【 0 0 1 3 】

エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリ等が挙げられる。また、エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス、エンテロバクター・アエロゲネス等が挙げられる。

尚、近年、エンテロバクター・アグロメランスは、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) 又はパントエア・アナナティス (*P. ananatis*)、パントエア・スチューアルティ (*P. stewartii*) アグロメランス等に再分類されているものがある。本発明においては、 $\gamma$ -プロテオバクテリアに分類され、かつ、arcA遺伝子を有するものであれば、エンテロバクター属又はパントエア属のいずれに属するものであってもよい。

## 【 0 0 1 4 】

エシェリヒア・コリを遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、E. coli K12株及びその誘導体を用いることができる。また、エンテロバクター・アグロメランスを遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、エンテロバクター・アグロメランス AJ 13355 株 (FERM BP-6614)、AJ 13356 株 (FERM BP-6615) 及びそれらの誘導体を用いることができる。

## 【 0 0 1 5 】

本発明の  $\gamma$ -プロテオバクテリアは、上記細菌であって、目的物質の生産能を有する細菌である。「目的物質の生産能」とは、本発明の細菌を培地に培養したときに、目的物質を細胞又は培地から回収できる程度に生産する能力をいう。

本発明により製造される目的物質としては、 $\gamma$ -プロテオバクテリアによって生産され得るもので、かつ、TCAサイクルを経由して合成される物質、又はそれらの物質を基質として合成される物質であれば特に限定されない。たとえば、L

ーリジン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、などの種々のアミノ酸、L-ホモセリン、コハク酸などの有機酸など、従来より $\gamma$ -プロテオバクテリアにより生産されてきたものが挙げられる。また、従来 $\gamma$ -プロテオバクテリアにより工業的に生産されていない物質であっても、TCAサイクルを経由して合成される物質を基質として合成される得る限り、本発明を適用することができる。

## 【 0 0 1 6 】

L-リジン生産性の $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、L-リジンアナログに耐性を有する変異株が例示できる。このL-リジンアナログは、L-アミノ酸の増殖を阻害するようなものであるが、その抑制はL-リジンが培地中に共存すれば、全体的または部分的に解除されるようなものである。たとえば、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)、 $\gamma$ -メチルリジン、 $\alpha$ -クロロカプロラクタムなどがある。これらのリジンアナログに耐性を有する変異株は、通常的人工変異操作を $\gamma$ -プロテオバクテリアに施すことにより得られる。L-リジン製造に用いる菌株として、具体的にはエシェリヒア・コリAJ11442(FERM BP-1543、NRRL B-12185；特開昭56-18596号及び米国特許第4346170号参照)、エシェリヒア・コリVL611が挙げられる。これらの微生物のアスパルトキナーゼは、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されている。

## 【 0 0 1 7 】

その他にも、たとえば後述のL-スレオニン生産菌が挙げられる。L-スレオニン生産菌も、一般的にはそのアスパルトキナーゼのL-リジンによる阻害が解除されているからである。

## 【 0 0 1 8 】

後記実施例においては、エシェリヒア・コリのL-リジン生産菌として、WC196株を用いた。本菌株は、エシェリヒア・コリK-12由来のW3110株にAEC耐性を付与することによって育種されたものである。同株は、エシェリヒア・コリAJ13069株と命名され、平成6年12月6日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日

本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に受託番号FERM P-14690として寄託され、平成7年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている (W096/17930号国際公開パンフレット参照)。

## 【 0 0 1 9 】

L-スレオニン生産性の $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、エシェリヒア・コリ VKPM B-3996 (RIA 1867) (米国特許第5,175,107号参照)、MG442株 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russia), 14, 947-956 (1978)参照) などが挙げられる。

## 【 0 0 2 0 】

$\gamma$ -プロテオバクテリアに属し、L-グルタミン酸生産能を有する微生物としては、たとえば、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損もしくは、低下した微生物が挙げられる。 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損もしくは低下したエシェリヒア属細菌およびその取得方法は、特開平5-244970号公報及び特開平7-203980号公報に記載されている。具体的には次のような株が挙げられる。

## 【 0 0 2 1 】

エシェリヒア・コリ W3110sucA::Km<sup>r</sup>

エシェリヒア・コリ AJ12624 (FERM BP-3853)

エシェリヒア・コリ AJ12628 (FERM BP-3854)

エシェリヒア・コリ AJ12949 (FERM BP-4881)

## 【 0 0 2 2 】

エシェリヒア・コリ W3110sucA::Km<sup>r</sup>は、エシェリヒア・コリ W3110の $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (以下、「sucA遺伝子」) と略す) が破壊されて得られた株であり、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ完全欠損株である。

## 【 0 0 2 3 】

$\gamma$ -プロテオバクテリア属に属し、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損もしくは低下した微生物およびその取得方法は、特開平5-244970号公報及

び特開平7-203980号公報に記載されている。

【 0 0 2 4 】

L-イソロイシン生産性の $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、エシェリヒア・コリKX141 (VKPM B-4781) (欧州特許出願公開第519,113号参照) が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

L-ホモセリン生産性の $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、C600株 (Appleyard R. K., Genetics, 39, 440-452 (1954) 参照) のLeu<sup>+</sup>復帰変異株であるNZ10株が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

コハク酸生産性の $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、エシェリヒア・コリを用いた例が知られている (Wang, X., et al., Appl. biochem. Biotech., 70-72, 919-928 (1998)) 。

【 0 0 2 7 】

また、L-アミノ酸生産能を有する $\gamma$ -プロテオバクテリアは、L-アミノ酸の生合成に関与する遺伝情報を担うDNAを遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても、育種することができる。例えば、L-リジン生産菌においては、導入される遺伝子は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパルトキナーゼ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ等、L-リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子である。ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、又はアスパルトキナーゼ及びジヒドロピコリン酸合成酵素のようにL-アスパラギン酸、又はL-リジンによるフィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。

【 0 0 2 8 】

また、L-グルタミン酸生産菌においては、導入される遺伝子として、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、グルタミンシンテターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンター

ぜ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセルムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼなどがある。

## 【 0 0 2 9 】

さらに、目的とするL-アミノ酸の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。たとえば、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（W095/23864号国際公開パンフレット参照）。また、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼなどがある。

## 【 0 0 3 0 】

上記のような目的物質産生能を有する $\gamma$ -プロテオバクテリアの育種において、 $\gamma$ -プロテオバクテリアに遺伝子を導入、増強するには、 $\gamma$ -プロテオバクテリア細胞内で自律複製可能なベクターに遺伝子を連結して組換えDNAを作製し、それで $\gamma$ -プロテオバクテリアを形質転換する方法がある。その他にトランスダクション、トランスポゾン（Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol. 1, 4 17 (1983)）、Muファージ（特開平2-109985号）または相同組換え（Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)）を用いた方法で宿主染色体に目的遺伝子を組み込むこともできる。また、PCR反応により生成した直鎖上DNAを用いて遺伝子を破壊する方法によっても目的遺伝子を導入することができる（Kirill A. Datsenko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97 (12), 6640-6645 (2000)）。

## 【 0 0 3 1 】

上記のように組換えDNA技術により育種された $\gamma$ -プロテオバクテリアとしては、例えば、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するジヒドロジピコリン酸合成酵素、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ等の活性が増強され、L-リジン生産能を有するエシェリヒア属細菌（米国特許第6,040,160号）、あるいは、クエン酸シンターゼ、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ、又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性が高められ、L-グルタミン酸生産能を有するエンテロバクター属細菌が挙げられる（EP 0 952 221 A2、EP 0 999 282 A2）。

## 【 0 0 3 2 】

本発明に用いる $\gamma$ -プロテオバクテリアは、上記のような目的物質を産生する能力を有し、かつ、細胞内でArcAタンパク質が正常に機能しないように改変された細菌である。「ArcAタンパク質が正常に機能しないように改変された」とは、ArcAタンパク質の機能が全く消失するか、あるいは、エシェリヒア属細菌の非改変株、例えば野生株に比べて該機能が低下するように改変されたことを意味する。ArcAタンパク質が正常に機能しない状態としては、例えば、arcA遺伝子の転写又は翻訳が妨げられ、同遺伝子産物であるArcAタンパク質が産生されないか、あるいは産生が低下した状態であってもよいし、産生されるArcAタンパク質に変異が起こり、ArcAタンパク質の本来の機能が低下又は消失した状態であってもよい。ArcAタンパク質が正常に機能しない $\gamma$ -プロテオバクテリアとして、典型的には、染色体上のarcA遺伝子が遺伝子組換え技術により破壊された遺伝子破壊株、及び、染色体上のarcA遺伝子の発現調節配列又はコード領域に変異が生じたことにより、機能を有するArcAタンパク質が産生されないようになった変異株が挙げられる。

## 【 0 0 3 3 】

本発明の細菌の育種に用いられる野生株又は非改変株が保持するArcAタンパク質としては、例えば、配列番号18に示すアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。また、arcA遺伝子としては、例えば、配列番号17に示す塩基配列を

有するDNAが挙げられる。また、同塩基配列において、各々のコドンを他の等価のコドンに置換した配列であってもよい。なお、本発明において「タンパク質をコードするDNA」とは、DNAが二本鎖の場合にはそのいずれか一方の鎖がタンパク質をコードすることを意味する。

## 【 0 0 3 4 】

また、野生株又は非改変株が保持するArcAタンパク質は、野生型タンパク質には限られず、ArcAタンパク質の活性を有している限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含んでいてもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には2から30個、好ましくは、2から20個、より好ましくは2から10個である。

## 【 0 0 3 5 】

前記「ArcAタンパク質の活性」とは、同タンパク質が正常に機能している場合に比べて、正常に機能しないときに目的物質の生産能を向上させる活性である。言い換えれば、ArcAタンパク質の活性とは、同タンパク質が正常に機能しないように改変されたγ-プロテオバクテリアが、γ-プロテオバクテリアの非改変株、例えば野生株よりも多量に目的物質を培地中に生産蓄積することを意味する。エシェリヒア・コリの野生株としては、例えばK12株又はその誘導体、例えばE. coli MG1655株 (ATCC No.47076)、及びW3110株 (ATCC No.27325) が挙げられる。また、エンテロバクター・アグロメランズの非改変株としては、AJ13355株 (FERM BP-6614)、AJ13356株 (FERM BP-6615) 株が挙げられる。

## 【 0 0 3 6 】

上記のようなアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、ArcAタンパク質を保持する微生物の個体差、種や株の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutationまたはvariation) も含まれる。

## 【 0 0 3 7 】

上記のようなarcA遺伝子の変異体又はバリエーションとしては、配列番号17の塩基番号101～817からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプロー



ブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつArcAと同様の活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

## 【0038】

プローブとして、配列番号17の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号17の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、配列番号17の塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

## 【0039】

以下、arcA遺伝子又はArcAタンパク質というときは、配列番号17又は配列番号18に示す塩基配列又はアミノ酸配列を有するものに限られず、これらの変異体又はホモログも含まれる。

## 【0040】

本発明の細菌は、ArcAタンパク質が正常に機能しないように改変された細菌であり、具体的には、例えば、arcA遺伝子が破壊されたγ-プロテオバクテリアである。このような細菌は、例えば、遺伝子組換え法を用いた相同組換え法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972)); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)) により、染色体上のarcA遺伝子を、正常に機能しないarcA遺伝子（以下、「破壊型arcA遺伝子」ということがある）で置換することによって行うことができる。

## 【 0 0 4 1 】

相同組換えの機構は以下のとおりである。染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体が染色体上に組み込まれる。この後さらに染色体上の相同性を有する配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により破壊された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、破壊型arcA遺伝子が、染色体上の正常なarcA遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

## 【 0 0 4 2 】

このような相同組換えによる遺伝子破壊技術は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法、温度感受性プラスミドを用いる方法等が利用できる。また、薬剤耐性等のマーカー遺伝子が内部に挿入されたarcA遺伝子を含み、かつ、目的とする微生物細胞内で複製できないプラスミドを用いることによっても、arcA遺伝子の破壊を行うことができる。すなわち、前記プラスミドで形質転換され、薬剤耐性を獲得した形質転換体は、染色体DNA中にマーカー遺伝子が組み込まれている。このマーカー遺伝子は、その両端のarcA遺伝子配列と染色体上のこれらの遺伝子との相同組換えによって組み込まれる可能性が高いため、効率よく遺伝子破壊株を選択することができる。

## 【 0 0 4 3 】

エシェリヒア属細菌で機能する温度感受性プラスミドとしては、pMAN997 (WO 99/03988号国際公開パンフレット)、pHSG415、pHSG422 (Hashimoto-Gotoh, T. et al, Gene, 16, 227-235 (1981)) 等が挙げられる。

## 【 0 0 4 4 】

遺伝子破壊に用いる破壊型arcA遺伝子は、具体的には、制限酵素消化及び再結合によるこれらの遺伝子の一定領域の欠失、これらの遺伝子への他のDNA断片（マーカー遺伝子等）の挿入、または部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)) や次亜硫酸ナトリウム、

ヒドロキシルアミン等の化学薬剤による処理 (Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270(1978)) によって、arcA遺伝子のコーディング領域またはプロモーター領域等の塩基配列の中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることにより、コードされるリプレッサーの活性を低下又は消失させるか、又はarcA遺伝子の転写を低下または消失させることにより、取得することができる。これらの態様の中では、制限酵素消化及び再結合によりarcA遺伝子の一定領域を欠失させる方法、又はこれらの遺伝子へ他のDNA断片を挿入する方法が、確実性及び安定性の点から好ましい。

## 【 0 0 4 5 】

arcA遺伝子は、配列自体が公知であり、それらの配列に基づいて、PCR法又はハイブリダイゼーション法等によって容易に取得することができる。尚、遺伝子破壊に用いるarcA遺伝子は、目的とする細菌が保持するarcA遺伝子と相同組換えが生じる程度の相同性を有していればよく、具体的には、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有していればよい。

## 【 0 0 4 6 】

目的とする遺伝子が破壊されたことは、サザンブロッティングやPCR法により、染色体上の遺伝子を解析することによって、確認することができる。

## 【 0 0 4 7 】

本発明に用いる各種遺伝子の取得、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989)に記載されている。

## 【 0 0 4 8 】

また、機能を有するArcAタンパク質が産生されないようになった変異株は、 $\gamma$ -プロテオバクテリアを紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸などの通常変異処理に用いられる変異剤によって処理することによって、取得することができる。

## 【 0 0 4 9 】

上記のようにして得られる、目的物質生産能を有し、かつ、細胞内でArcAタンパク質が正常に機能しないように改変された $\gamma$ -プロテオバクテリアを培地に培養し、該培地又は菌体中に目的物質を生成蓄積させ、該培地又は菌体より目的物質を採取することにより、目的物質を製造することができる。本発明において、上記の性質を有する $\gamma$ -プロテオバクテリアを用いることにより、目的物質の生産効率を向上させることができる。これは、arcA遺伝子に関する $\gamma$ -プロテオバクテリア野生株は、培養のarcA遺伝子が発現し、TCAサイクル上の遺伝子の発現を抑制するのに対し、ArcAタンパク質が正常に機能しない株では、TCAサイクル上の遺伝子の発現抑制が解除されるためであると推測される。

#### 【0050】

本発明に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオンおよび必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地でよい。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、アラビノース、マルトース、キシロース、トレハロース、リボースや澱粉の加水分解物などの糖類、グリセロール、マンニトールやソルビトールなどのアルコール類、グルコン酸、フマル酸、クエン酸やコハク酸等の有機酸類を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養素としては、ビタミンB1等のビタミン類、アデニンやRNA等の核酸類などの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カルシウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガニオン等が少量添加される。

#### 【0051】

培養は、使用する菌株に応じて従来より用いられてきた周知の条件で行ってかまわない。たとえば、好氣的条件下で16～72時間程度実施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは4.5～8に制御する。なお、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、さらにアンモニアガス等を使用することができる。

#### 【0052】

培地又は菌体からの目的物質の採取は、本願発明において特別な方法が必要とされることはない。すなわち、目的物質の採取は、従来より周知となっているイオン交換樹脂法、沈殿法その他の方法を、目的物質の種類に応じて組み合わせることにより実施できる。また、菌体中に蓄積した目的物質の採取は、菌体を物理的又は酵素的に破壊し、目的物質に応じて菌体抽出液又は膜画分から採取することができる。尚、目的物質によっては、目的物質を菌体中に存在したままの状態、微生物触媒等として利用することもできる。

【 0 0 5 3 】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【 0 0 5 4 】

【実施例 1】 エシェリヒア・コリの *arcA*, *dam*, *fnr* 遺伝子の破壊

エシェリヒア・コリ (*E. coli*) K-12株のゲノムDNAの全塩基配列は既に明らかにされている (Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A. et al., Science, 227, 1453-1474 (1997); <ftp://ftp.genetics.wisc.edu/pub/sequence/ecolim52.seq.gz>)。既知の *arcA*, *dam*, *fnr* 遺伝子の塩基配列に基づいて、*arcA*, *dam*, *fnr* の各遺伝子破壊株を作製した。以下の操作において、ゲノムDNAの抽出は、QIAGEN-Genomic-tip System (キアゲン社製) を用いた。

【 0 0 5 5 】

(1) エシェリヒア・コリの *arcA* 遺伝子の破壊

報告されている *arcA* の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリ MG1655株のゲノムDNAを鋳型として、*arcA* 遺伝子のN末およびC末断片をPCR法により増幅した。PCRは、Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造社製) を用い、添付説明書にしたがって行った。N末端断片増幅用PCR用プライマーにはプライマー 1、2 を、C末端断片増幅用PCR用プライマーにはプライマー 3、4 を用いた。プライマー 1 にはHindIIIサイトが、プライマー 4 にはXbaIサイトがそれぞれデザインされている。

【 0 0 5 6 】

プライマー 1 : `cccaagcttaaagccctttacttagctta` (GenBankのaccession No. AE00

0510の塩基配列の塩基番号5482-5501に相補的な配列の5' 末にcccおよびHindIIIサイトを付加した配列：配列番号1)

プライマー2：tccgcgccatctgtcgttc (GenBankのaccession No. AE000510の塩基配列の塩基番号4851-4870の配列：配列番号2)

プライマー3：gaagcgacagatggcgcgataaagctacaagttcaatggt (GenBankのaccession No. AE000510の塩基配列の4541-4560に相補的な配列の5' 末にGenBankのaccession No. AE000510の塩基配列の塩基番号4851-4870に相補的な配列を付加した配列：配列番号3)

プライマー4：gggtctagaggttgaaaaataaaaacggc (GenBankのaccession No. AE000510の塩基配列の塩基番号4188-4207の配列に5' 末にgggおよびXbaIサイトを付加した配列：配列番号4)

【0057】

PCR後の増幅DNA断片は、それぞれ、QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン社製) にて精製し、精製したN末端DNA断片およびC末端DNA断片、プライマー1、4を用いて、クロスオーバーPCR法 (A. J. Link, D. Phillips, G. M. Church, Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237 (1997)) により、欠損型arcA断片を得た。精製したDNA断片を、HindIII及びXbaI (宝酒造社製) にて切断した後、フェノール/クロロホルム処理、及びエタノール沈殿を行った。同様にHindIII及びXbaIで切断した温度感受性プラスミドpMAN997 (WO 99/03988号国際公開パンフレット) と前記DNA断片とをDNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて連結した。この連結反応液にて、JM109コンピテント細胞 (宝酒造社製) を形質転換し、アンピシリン (シグマ社製) を25  $\mu$ g/mL含むLB寒天プレート (LB+アンピシリンプレート) に塗布した。30℃で1日培養後、生育したコロニーを25  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含むLB培地で30℃にて試験管培養し、自動プラスミド抽出機PI-50 (クラボウ社製) を用いてプラスミド抽出を行った。得られたプラスミドをHindIII及びXbaIで切断し、アガロースゲル電気泳動を行って、目的断片が挿入されているプラスミドをarcA破壊用プラスミドpMAN\_ $\Delta$ arcAとした。尚、前記pMAN997は、pMAN031 (S. Matsuyama and S. Mizushima, J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)) とpUC19 (宝酒造社製) のそれぞれのVspI-HindIII断片を繋ぎ換えたも

のである。

#### 【 0 0 5 8 】

プラスミド pMAN\_Δ arcA でエシェリヒア・コリ WC196 株を C. T. Chung らの方法により形質転換し、LB+アンピシリンプレートで 30℃ でコロニーを選択した。選択したクローンを 30℃ で一晩液体培養した後、培養液を  $10^{-3}$  希釈して LB+アンピシリンプレートにまき、42℃ でコロニーを選択した。選択したクローンを LB+アンピシリンプレートに塗り広げて 30℃ で培養した後、プレートの 1/8 の菌体を LB 培地 2 mL に懸濁し、42℃ で 4~5 時間振とう培養した。 $10^{-5}$  希釈した培養液を LB プレートにまき、得られたコロニーのうち数百コロニーを LB プレートと LB+アンピシリンプレートに植菌し、生育を確認することで、アンピシリン感受性株を選択した。アンピシリン感受性株の数株についてコロニー PCR を行い、arcA 遺伝子の欠失を確認した。こうして E. coli WC196 由来の arcA 破壊株 WC196 Δ arcA を得た。

#### 【 0 0 5 9 】

##### (2) エシェリヒア・コリの dam 遺伝子の破壊

(1) と同様の方法を用い、WC196 より dam 遺伝子破壊株を作製した。

報告されている dam 遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリ MG1655 株のゲノム DNA を鋳型として、dam 遺伝子の N 末および C 末断片を PCR 法により増幅した。N 末端断片増幅用 PCR 用プライマーにはプライマー 5、6 を、C 末端断片増幅用 PCR 用プライマーにはプライマー 7、8 を用いた。プライマー 5 には HindIII サイトが、プライマー 8 には XbaI サイトがそれぞれデザインされている。

#### 【 0 0 6 0 】

プライマー 5 : cccaagcttccgtggtatgtcctgggttc (GenBank の accession No. AE000414 の塩基配列の塩基番号 5150-5169 に相補的な配列の 5' 末に ccc および HindIII サイトを付加した配列 : 配列番号 5)

プライマー 6 : agactgatcaggtcgctatt (GenBank の accession No. AE000414 の塩基配列の塩基番号 4741-4760 の配列 : 配列番号 6)

プライマー 7 : aatagcgacctgatcagtctgccttatgcaccgctgtctg (GenBank の accessi

on No. AE000414の塩基配列の4361-4380に相補的な配列の5' 末にGenBankのaccession No. AE000414の塩基配列の塩基番号4741-4760に相補的な配列を付加した配列：配列番号 7)

プライマー 8 : gggtctagacgtcagattgggaacatagt (GenBankのaccession No. AE000414の塩基配列の塩基番号3931-3950の配列に5' 末にgggおよびXbaIサイトを付加した配列：配列番号 8)

#### 【 0 0 6 1 】

PCR後の増幅DNA断片は、それぞれ、QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン社製) にて精製し、精製したN末端DNA断片およびC末端DNA断片、プライマー 5、8 を用いて、クロスオーバーPCR法により、欠損型dam断片を得た。後の操作は(1)と同様に行い、dam破壊株WC196 Δ damを得た。

#### 【 0 0 6 2 】

##### (3) エシェリヒア・コリのfnr遺伝子の破壊

(1)と同様の方法を用い、WC196よりfnr遺伝子破壊株を作製した。

報告されているfnr遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAを鋳型として、fnr遺伝子のN末およびC末断片をPCR法により増幅した。

N末端断片増幅用PCR用プライマーにはプライマー 9、10 を、C末端断片増幅用PCR用プライマーにはプライマー 11、12 を用いた。プライマー 9 にはHindIII サイトが、プライマー 12 にはXbaI サイトがそれぞれデザインされている。(1)と同様の方法を用い、WC196よりfnr破壊株を得た。

#### 【 0 0 6 3 】

プライマー 9 : cccaagcttgcaattgggccgtcctggcg (GenBankのaccession No. AE000231の塩基配列の塩基番号7981-8000に相補的な配列の5' 末にcccおよびHindIII サイトを付加した配列：配列番号 9)

プライマー 10 : tcaagctgatcaagctcatg (GenBankのaccession No. AE000231の塩基配列の塩基番号7501-7520の配列：配列番号 10)

プライマー 11 : gaaaaatgccgaccaacgtctcaagctgatcaagctcatg (GenBankのaccession No. AE000231の塩基配列の7121-7140に相補的な配列の5' 末にGenBankのac



cession No. AE000231の塩基配列の塩基番号7501-7520に相補的な配列を付加した配列：配列番号 1 1)

プライマー 1 2 : gggtctagattggcgtcctggtaggat (GenBankのaccession No. AE000231の塩基配列の塩基番号6671-6690の配列に5' 末にgggおよびXbaIサイトを付加した配列：配列番号 1 2)

【 0 0 6 4 】

PCR後の増幅DNA断片は、それぞれ、QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン社製) にて精製し、精製したN末端DNA断片およびC末端DNA断片、プライマー 9、1 2 を用いて、クロスオーバーPCR法により、欠損型fnr断片を得た。後の操作は (1) と同様に行い、fnr破壊株WC196 Δ fnrを得た。

【実施例 2】 エシェリヒア・コリarcA破壊株のL-リジン生産への効果

arcA遺伝子破壊株WC196 Δ arcA株、dam遺伝子破壊株WC196 Δ dam株およびfnr遺伝子破壊株WC196 Δ fnr株、ならびにそれらの親株であるWC196を培養し、L-リジン生産量を測定した。以下に、そのための培地および培養方法ならびに分析方法を示す。

【 0 0 6 5 】

〔基本培地E-100培地〕

	最終濃度
グルコース	10 g/L (別殺菌)
NH <sub>4</sub> Cl	20 mM
NaHPO <sub>4</sub>	40 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.01 mM
FeSO <sub>4</sub>	0.01 mM
MnSO <sub>4</sub>	0.01 mM
クエン酸	5 mM
チアミン塩酸塩	2 mM
カザミノ酸	2.5 g/L
MES-NaOH (pH6.8)	50 mM

【 0 0 6 6 】

〔培養方法〕

リフレッシュ(refresh)培養；保存状態の菌を接種

LB寒天培地（必要に応じて薬剤添加）、37℃、24時間

種(seed)培養；リフレッシュ培養した菌を2ml LB培地に接種

LB培地（必要に応じて薬剤添加）、37℃、一晚

主(main)培養；種培養菌体プレート $\frac{1}{16}$ を接種

E-100培地（必要に応じて、薬剤添加）、37℃、20ml/500ml容坂口フラスコ

【 0 0 6 7 】

〔分析方法〕

培養液500  $\mu$ lを経時的にサンプリングし、培養液中のグルコース濃度、L-リジン蓄積を測定した。グルコース濃度、及びL-リジン濃度は、15,000rpmで5分間遠心し、その上清液を適当倍率に水で希釈した培養液をバイオテックアナライザー（サクラ精器）により測定した。結果を図1に示す。

【 0 0 6 8 】

その結果、fnr遺伝子破壊株は対照株と同等のL-リジン蓄積を示し、dam遺伝子破壊株は対照株と比較して蓄積が減少することが観察された。一方、arcA遺伝子破壊株のL-リジン蓄積が対照株と比較して向上することが認められた。

【 0 0 6 9 】

【実施例3】エシェリヒア・コリarcA破壊株のL-グルタミン酸生産への効果

実施例2において、arcA遺伝子破壊によりL-リジン蓄積向上効果が認められたため、ここでは、arcA遺伝子のL-グルタミン酸発酵への効果を検討した。

L-グルタミン酸生産に対するエシェリヒア・コリMG1655におけるarcA遺伝子の欠損効果を確認するため、エシェリヒア・コリMG1655由来のsucA欠損株(MG1655  $\Delta$  sucA)及びエシェリヒア・コリMG1655由来のsucA、arcA二重欠損株(MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  arcA)を構築した。

【 0 0 7 0 】

(1) エシェリヒア・コリのsucA遺伝子の破壊

実施例 1 と同様の方法を用い、MG1655よりsucA遺伝子破壊株を作製した。

報告されているfnr遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAを鋳型として、fnr遺伝子のN末およびC末断片をPCR法により増幅した。

N末端断片増幅用PCR用プライマーにはプライマー 1 3、1 4 を、C末端断片増幅用PCR用プライマーにはプライマー 1 5、1 6 を用いた。プライマー 9 にはHindIIIサイトが、プライマー 1 2 にはXbaIサイトがそれぞれデザインされている。

(1) と同様の方法を用い、MG1655よりsucA遺伝子破壊株を得た。

#### 【0071】

プライマー 1 3 : cccaagcttctgtcccctgacactaagaca (GenBankのaccession No. AE000175の塩基配列の塩基番号10721-10740の配列の5' 末にcccおよびHindIIIサイトを付加した配列 : 配列番号 1 3)

プライマー 1 4 : cgaggtaacgttcaagacct (GenBankのaccession No. AE000175の塩基配列の塩基番号11501-11520に相補的な配列 : 配列番号 1 4)

プライマー 1 5 : aggtcttgaacgttacctcgatccataacgggcagggcgc (GenBankのaccession No. AE000175の塩基配列の12801-12820の配列の5' 末にGenBankのaccession No. AE000175の塩基配列の塩基番号10501-11520の配列を付加した配列 : 配列番号 1 5)

プライマー 1 6 : gggtctagaccactttgtcagtttcgatt (GenBankのaccession No. AE000175の塩基配列の塩基番号13801-13820に相補的な配列に5' 末にgggおよびXbaIサイトを付加した配列 : 配列番号 1 6)

#### 【0072】

PCR後の増幅DNA断片は、それぞれ、QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン社製) にて精製し、精製したN末端DNA断片およびC末端DNA断片、プライマー 1 3、1 6 を用いて、クロスオーバーPCR法により、欠損型sucA断片を得た。後の操作は(1) と同様に行い、sucA破壊株MG1655 Δ sucAを得た。

#### 【0073】

(2) エシェリヒア・コリのsucA、arcA遺伝子二重欠損株の作製

実施例 1 と同様の方法を用い、MG1655 Δ sucAよりarcA遺伝子を破壊し、sucA、

arcA二重欠損株を作製した (MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  arcA)。

同様にして、sucA、dam二重欠損株 (MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  dam)、及びsucA、fnr二重欠損株を作製した (MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  fnr)。

#### 【 0 0 7 4 】

arcA遺伝子破壊のL-グルタミン酸発酵への効果を検討するため、各遺伝子二重欠損株MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  arcA株、MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  dam、及びMG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  fnrを、sucA遺伝子欠損株MG1655  $\Delta$  sucAを対照として培養し、L-グルタミン酸生産量を測定した。以下に、そのための培地および培養方法ならびに分析方法を示す。

#### 【 0 0 7 5 】

##### 〔基本培地MS培地〕

##### 最終濃度

グルコース	40 g/L (別殺菌)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g/L (別殺菌)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
Yeast Extract	2 g/L
FeSO <sub>4</sub>	0.01 g/L
MnSO <sub>4</sub>	0.01 g/L
CaCO <sub>3</sub>	30 g/L (別殺菌)

#### 【 0 0 7 6 】

##### 〔培養方法〕

リフレッシュ(refresh)培養；保存状態の菌を接種

LB寒天培地（必要に応じて薬剤添加）、37℃、24時間  
種(seed)試験管培養；リフレッシュ培養した菌を接種

LB液体培地（必要に応じて薬剤添加）、37℃、16時間  
主(main)培養；種培養液体培地から10%接種

MS液体培地（必要に応じて薬剤添加）、37℃

20ml/500ml容坂口フラスコ

#### 【 0 0 7 7 】

## 〔分析方法〕

培養液500  $\mu$ lを経時的にサンプリングし、培養液中のグルコース濃度、L-グルタミン酸蓄積を測定した。グルコース濃度、及びL-リジン濃度は、15,000rpmで5分間遠心し、その上清液を適当倍率に水で希釈した培養液をバイオテックアナライザー（サクラ精器）により測定した。残糖がなくなった時点でのL-グルタミン酸蓄積と収率を表1に示した。

【0078】

【表1】

表1：arcA破壊株のL-グルタミン酸蓄積及び収率

菌 株	L-グルタミン酸蓄積 (g/L)	L-グルタミン酸収率 (%)
MG1655 $\Delta$ sucA	15.4	36.9
MG1655 $\Delta$ sucA $\Delta$ arcA	17.0	41.7
MG1655 $\Delta$ sucA $\Delta$ dam	14.2	35.5
MG1655 $\Delta$ sucA $\Delta$ fnr	14.6	36.6

【0079】

その結果、sucA、dam遺伝子破壊株のグルタミン酸蓄積、収率ともに対照株よりやや劣り、sucA、fnr遺伝子破壊株においては対照株と同程度であった。一方、sucA、arcA遺伝子破壊株のL-グルタミン酸蓄積、収率はともに対照株と比較して向上することが認められた。

【0080】

## 【発明の効果】

本発明により、 $\gamma$ -プロテオバクテリアを用いて、L-アミノ酸などの有用物質を生産する際に、生産効率を向上させることができる。

【0081】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> 発酵法による目的物質の製造法

<130> P-9999

<140>

<141> 2002-07-12

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 8 2 】

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli arcA gene

<400> 1

cccaagcttaaagccctttacttagctta 29

【 0 0 8 3 】

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli arca gene

<400> 2

tccgcgccatctgtcgcttc 20

【 0 0 8 4 】

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
sequencing of Escherichia coli arca gene

<400> 3

gaagcgacagatggcgcgataaagctacaagttcaatggt 40

【 0 0 8 5 】

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
sequencing of Escherichia coli arca gene

<400> 4

gggtctagaggttgaaaaataaaaacggc 29

【 0 0 8 6 】

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli dam gene

<400> 5

cccaagcttccgtggtatgtcctggtttc 29

【 0 0 8 7 】

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli dam gene

<400> 6

agactgatcaggtcgctatt 20

【 0 0 8 8 】

<210> 7

<211> 40



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
sequencing of Escherichia coli dam gene

<400> 7

aatagcgacctgatcagtcctgccttatgcaccgctgtctg 40

【 0 0 8 9 】

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli dam gene

<400> 8

gggtctagacgtcagattgggaacatagt 29

【 0 0 9 0 】

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

amplifying Escherichia coli fnr gene

<400> 9

cccaagcttgcaattgggcccgtcctggcg 29

【 0 0 9 1 】

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli fnr gene

<400> 10

tcaagctgatcaagctcatg 20

【 0 0 9 2 】

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli fnr gene

<400> 11

gaaaaatgccgaccaacgtctcaagctgatcaagctcatg 40

【 0 0 9 3 】

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
sequencing of Escherichia coli fnr gene

<400> 12

gggtctagattggtcgtcctggttaggat 29

【 0 0 9 4 】

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
sequencing of Escherichia coli sucA gene

<400> 13

cccaagcttctgcccctgacactaagaca 29

【 0 0 9 5 】

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli sucA gene

<400> 14

cgaggtaacgttcaagacct 20

【 0 0 9 6 】

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli sucA gene

<400> 15

aggtcttgaacgttacctcgatccataacgggcagggcgc 40

【 0 0 9 7 】

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying Escherichia coli sucA gene

<400> 16

gggtctagaccactttgtcagtttcgatt 29

【 0 0 9 8 】

<210> 17

<211> 927

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (101)..(817)

<400> 17

gtcatgttac gccgatcatg ttaatttgca gcatgcatca ggcaggtcag ggacttttgt 60  
acttcctgtt tcgatttagt tggcaattta ggtagcaaac atg cag acc ccg cac 115

Met Gln Thr Pro His

1 5

att ctt atc gtt gaa gac gag ttg gta aca cgc aac acg ttg aaa agt 163  
Ile Leu Ile Val Glu Asp Glu Leu Val Thr Arg Asn Thr Leu Lys Ser

10 15 20

att ttc gaa gcg gaa ggc tat gat gtt ttc gaa gcg aca gat ggc gcg 211  
Ile Phe Glu Ala Glu Gly Tyr Asp Val Phe Glu Ala Thr Asp Gly Ala

25 30 35

gaa atg cat cag atc ctc tct gaa tat gac atc aac ctg gtg atc atg 259  
Glu Met His Gln Ile Leu Ser Glu Tyr Asp Ile Asn Leu Val Ile Met

40 45 50

gat atc aat ctg ccg ggt aag aac ggt ctt ctg tta gcg cgt gaa ctg 307  
Asp Ile Asn Leu Pro Gly Lys Asn Gly Leu Leu Leu Ala Arg Glu Leu

55	60	65	
cgc gag cag gcg aat gtt gcg ttg atg ttc ctg act ggc cgt gac aac			355
Arg Glu Gln Ala Asn Val Ala Leu Met Phe Leu Thr Gly Arg Asp Asn			
70	75	80	85
gaa gtc gat aaa att ctc ggc ctc gaa atc ggt gca gat gac tac atc			403
Glu Val Asp Lys Ile Leu Gly Leu Glu Ile Gly Ala Asp Asp Tyr Ile			
	90	95	100
acc aaa ccg ttc aac ccg cgt gaa ctg acg att cgt gca cgc aac cta			451
Thr Lys Pro Phe Asn Pro Arg Glu Leu Thr Ile Arg Ala Arg Asn Leu			
	105	110	115
ctg tcc cgt acc atg aat ctg ggt act gtc agc gaa gaa cgt cgt agc			499
Leu Ser Arg Thr Met Asn Leu Gly Thr Val Ser Glu Glu Arg Arg Ser			
	120	125	130
gtt gaa agc tac aag ttc aat ggt tgg gaa ctg gac atc aac agc cgt			547
Val Glu Ser Tyr Lys Phe Asn Gly Trp Glu Leu Asp Ile Asn Ser Arg			
	135	140	145
tcg ttg atc ggc cct gat ggc gag cag tac aag ctg ccg cgc agc gag			595
Ser Leu Ile Gly Pro Asp Gly Glu Gln Tyr Lys Leu Pro Arg Ser Glu			
150	155	160	165
ttc cgc gcc atg ctt cac ttc tgt gaa aac cca ggc aaa att cag tcc			643
Phe Arg Ala Met Leu His Phe Cys Glu Asn Pro Gly Lys Ile Gln Ser			
	170	175	180
cgt gct gaa ctg ctg aag aaa atg acc ggc cgt gag ctg aaa ccg cac			691
Arg Ala Glu Leu Leu Lys Lys Met Thr Gly Arg Glu Leu Lys Pro His			
	185	190	195
gac cgt act gta gac gtg acg atc cgc cgt att cgt aaa cat ttc gaa			739
Asp Arg Thr Val Asp Val Thr Ile Arg Arg Ile Arg Lys His Phe Glu			
	200	205	210
tct acg ccg gat acg ccg gaa atc atc gcc acc att cac ggt gaa ggt			787

Ser Thr Pro Asp Thr Pro Glu Ile Ile Ala Thr Ile His Gly Glu Gly  
 215 220 225  
 tat cgc ttc tgc ggt gat ctg gaa gat taa tcggctttac caccgtcaaa 837  
 Tyr Arg Phe Cys Gly Asp Leu Glu Asp  
 230 235  
 aaaaacggcg ctttttagcg ccgtttttat ttttcaacct tatttccaga tacgtaactc 897  
 atcgtccggtt gtaacttctt tactggcttt 927

【 0 0 9 9 】

<210> 18  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 18  
 Met Gln Thr Pro His Ile Leu Ile Val Glu Asp Glu Leu Val Thr Arg  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Leu Lys Ser Ile Phe Glu Ala Glu Gly Tyr Asp Val Phe Glu  
 20 25 30  
 Ala Thr Asp Gly Ala Glu Met His Gln Ile Leu Ser Glu Tyr Asp Ile  
 35 40 45  
 Asn Leu Val Ile Met Asp Ile Asn Leu Pro Gly Lys Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60  
 Leu Ala Arg Glu Leu Arg Glu Gln Ala Asn Val Ala Leu Met Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Arg Asp Asn Glu Val Asp Lys Ile Leu Gly Leu Glu Ile Gly  
 85 90 95  
 Ala Asp Asp Tyr Ile Thr Lys Pro Phe Asn Pro Arg Glu Leu Thr Ile  
 100 105 110

Arg Ala Arg Asn Leu Leu Ser Arg Thr Met Asn Leu Gly Thr Val Ser			
115	120	125	
Glu Glu Arg Arg Ser Val Glu Ser Tyr Lys Phe Asn Gly Trp Glu Leu			
130	135	140	
Asp Ile Asn Ser Arg Ser Leu Ile Gly Pro Asp Gly Glu Gln Tyr Lys			
145	150	155	160
Leu Pro Arg Ser Glu Phe Arg Ala Met Leu His Phe Cys Glu Asn Pro			
165	170	175	
Gly Lys Ile Gln Ser Arg Ala Glu Leu Leu Lys Lys Met Thr Gly Arg			
180	185	190	
Glu Leu Lys Pro His Asp Arg Thr Val Asp Val Thr Ile Arg Arg Ile			
195	200	205	
Arg Lys His Phe Glu Ser Thr Pro Asp Thr Pro Glu Ile Ile Ala Thr			
210	215	220	
Ile His Gly Glu Gly Tyr Arg Phe Cys Gly Asp Leu Glu Asp			
225	230	235	

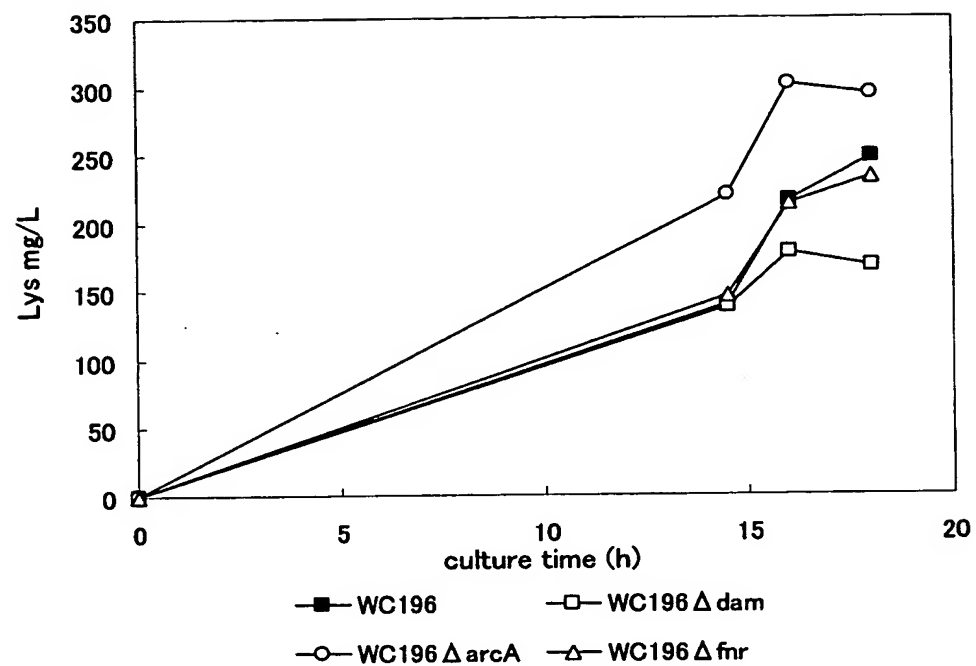
【図面の簡単な説明】

【図 1】 WC196、WC196 $\Delta$ arC、WC196 $\Delta$ dam、WC196 $\Delta$ fnrの蓄積パターンを示す図。



【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】  $\gamma$ -プロテオバクテリアを用いて発酵法により、L-アミノ酸等の有用物質を生産するに際し、生産効率を向上させる。

【解決手段】  $\gamma$ -プロテオバクテリアを培地に培養し、該培地又は菌体中に目的物質を生成蓄積させ、該目的物質を採取する、微生物を利用した目的物質の製造法において、前記  $\gamma$ -プロテオバクテリアとして、例えば、染色体上のarcA遺伝子が破壊されたことにより、細胞内でArcAタンパク質が正常に機能しない株を用いる。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日	1 9 9 1 年 7 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号
氏 名	味の素株式会社